SNI 8526:2018

Standar Nasional Indonesia

Tisu basah

ICS 11.080.20; 85.080.20

Daftar isi

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) 8526:2018, dengan judul *Tisu basah,* merupakan SNI hasil pengembangan sendiri.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 11-11 Produk Higiene Perbekelan Kesehatan Rumah Tangga. Standar ini telah dibahas dalam rapat-rapat teknis, dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus yang dilaksanakan di Jakarta pada tanggal 22 Januari 2018. Konsensus dihadiri oleh para pemangku kepentingan (*stakeholder*) terkait, yaitu perwakilan dari produsen, konsumen, pakar dan pemerintah, serta perwakilan dari lembaga penguji, asosiasi, perguruan tinggi, pakar serta instansi terkait.

Standar ini telah melalui tahap jajak pendapat pada tanggal 5 Maret 2018 sampai dengan tanggal 4 Mei 2018 dengan hasil akhir disetujui menjadi SNI.

Dalam standar ini digunakan kosa kata yang mempunyai maksud tertentu, yaitu:

- “harus” yang artinya disyaratkan.
- “sebaiknya” yang artinya direkomendasikan.

Perlu diperhatikan bahwa kemungkinan beberapa unsur dari dokumen standar ini dapat berupa hak paten. Badan Standardisasi Nasional tidak bertanggungjawab untuk pengidentifikasian salah satu atau seluruh hak paten yang ada.

Tisu basah

1 Ruang lingkup

Standar ini berlaku untuk produk tisu basah umum yang digunakan untuk membersihkan/menyegarkan kulit manusia dan bayi tapi tidak termasuk untuk penggunaan medis.

2 Acuan normatif

Dokumen acuan berikut sangat diperlukan untuk penerapan dokumen ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang disebutkan yang berlaku. Untuk acuan tidak bertanggal, edisi terakhir dari dokumen yang diacu (termasuk amandemennya) berlaku.

SNI ISO 12625-6, *Kertas tisu dan produk tisu – Bagian 6: Cara uji gramatur*

SNI ISO 536, *Kertas dan karton – Cara uji gramatur*

ISO 21148, *Cosmetics – Microbiology – General instructions for microbiological examination*

EN 12353, *Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including Legionella), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity*

3 Istilah dan definisi

3.1
tisu basah
produk tisu berupa lembaran *spunlace non woven* yang dibasahi dengan cairan pembasah yang disebut *premix* dengan rasio tertentu

3.2
spunlace non woven
lembaran tisu kering yang merupakan bahan baku untuk tisu basah, yang dibuat dari komposisi *rayon* dan *polyester,* dicampur dan disemprotkan dengan air lalu dikondisikan pada tekanan tinggi agar campuran serat menyatu dan tersambung hingga berbentuk lembaran tisu dengan kekuatan tertentu

3.3
premix
cairan pembasah yang digunakan pada produk tisu basah dari hasil pencampuran *demineral water* dengan beberapa bahan kimia sesuai dengan formulasi produk tisu basah yang akan diproduksi

3.4
gramatur
g
massa dari suatu satuan luas dari kertas tisu atau produk tisu yang ditentukan dengan prosedur dalam SNI ISO 12625-6

CATATAN Gramatur dinyatakan dalam gram per meter persegi (g/m^2) sesuai dengan SNI ISO 536.

4 Bahan baku

Tisu basah terbuat dari *spunlace non woven* dan cairan pembasah yang disebut *premix*.

5 Persyaratan mutu

Produk tisu basah harus memenuhi persyaratan yang ditetapkan dalam Tabel 1.

Tabel 1 – Persyaratan mutu tisu basah

No.	Parameter	Satuan	Persyaratan mutu
1.	Warna	-	Sesuai dengan warna *spunlace non woven* yang digunakan
2.	Berat dasar/gramatur	g/m^2	Minimal 25
3.	Kandungan cemaran logam : - Merkuri (Hg)	mg/L atau mg/kg	≤ 0,5
	- Timbal (Pb)	mg/L atau mg/kg	≤ 5
	- Arsen (As)	mg/L atau mg/kg	≤ 2
	- Kadmium (Cd)	mg/L atau mg/kg	≤ 2
4.	Kandungan cemaran mikroba : - Angka Lempeng Total (ALT)	koloni/g atau koloni/ml sampel	≤ 100
	- Angka Kapang Khamir (AKK)	koloni/g atau koloni/ml sampel	≤ 100
	- *Pseudomonas aeuruginosa*	per g atau per ml sampel	Negatif
	- *Staphylococcus aureus*	per g atau per ml sampel	Negatif
	- *Candida albicans*	per g atau per ml sampel	Negatif
5.	pH	-	3,5 sampai 7,5

6 Pengambilan contoh

Semua pak contoh harus dipilih secara acak untuk mewakili induk contoh. Pak contoh harus utuh dan tidak rusak.

Agar mendapatkan contoh yang benar-benar representatif, seluruh induk contoh harus tersedia untuk pengambilan contoh. Jumlah minimum pak contoh yang akan diambil, *n*, diberikan dalam tabel di bawah ini. Apabila seluruh induk contoh tidak tersedia, jumlah pak yang dipilih untuk pengambilan contoh harus disepakati antara pihak yang berkepentingan. Apabila tidak ada kesepakatan lain, jumlah tisu basah yang tersedia pada saat pengambilan contoh tidak boleh kurang dari setengah keseluruhan induk contoh.

Jika pak memiliki nomor identifikasi yang berkaitan dengan beberapa seri, pak contoh harus dipilih secara acak sesuai proporsi dengan jumlah pak pada tiap seri ini, berdasarkan Tabel 2 berikut ini :

Tabel 2 – Jumlah pak contoh yang akan diambil

Jumlah pak dalam induk contoh N	Jumlah minimal pak contoh n
Hingga 100	10
101 sampai dengan 200	15
201 sampai dengan 300	18
301 sampai dengan 400	20
401 sampai dengan 500	23
501 sampai dengan 600	25
601 sampai dengan 700	27
701 sampai dengan 800	29
801 sampai dengan 900	30
901 sampai dengan 1.000	32
Lebih dari 1.000	32

Dari masing-masing pak contoh diambil satu bahan uji. Catat nomor identifikasi dari semua pak yang dijadikan contoh. Semua bahan uji harus memiliki jumlah serat kering yang sama. Jumlah ini tergantung pada pengujian yang akan dilakukan. Biasanya 100 gram per bahan uji sudah mencukupi.

Gabungkan bahan uji untuk membentuk contoh total. Bungkus, untuk melindunginya dari kontaminasi. Hindarkan dari sinar matahari, panas dan udara lembab.

Jika tisu basah akan diuji untuk sisa logam, jangan gunakan alat logam dan buang potongan ujung tisu basah yang mungkin terkontaminasi oleh logam.

7 Cara uji

7.1 Warna

Produk tisu basah diamati secara vertikal, berwarna sama dengan warna *spunlace non woven* yang digunakan.

7.2 Berat dasar/gramatur

Cara uji berat dasar/gramatur mengacu pada SNI ISO 12625-6.

7.3 Cemaran logam

Cara uji cemaran logam pada tisu basah mengikuti peraturan yang berlaku.

7.4 Cemaran mikroba

7.4.1 Angka Lempeng Total (ALT)

Cara uji ALT mengikuti peraturan yang berlaku.

7.4.2 Angka Kapang Khamir (AKK)

Cara uji AKK mengikuti peraturan yang berlaku.

7.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Cara uji deteksi *Pseudomonas aeruginosa* sesuai Lampiran A.

7.4.4 *Staphylococcus aureus*

Cara uji deteksi *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran B.

7.4.5 *Candida albicans*

Cara uji deteksi *Candida albicans* sesuai Lampiran C.

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu pada Tabel 1.

9 Pengemasan

Proses pengemasan harus memenuhi ketentuan sebagai berikut :

a. Bahan kemasan yang bersentuhan langsung dengan produk terbuat dari bahan yang dapat mencegah terjadinya kebocoran, melindungi isi produk dari kontaminasi zat asing dari luar dan dari bahan kemasan itu sendiri.

b. Bahan kemasan yang bersentuhan langsung dengan produk tidak menimbulkan migrasi dari tinta / *content* bahan kemasan lainnya.

10 Pelabelan

Produk harus diberi label sesuai dengan ketentuan hukum yang berlaku.

Lampiran A
(normatif)
Cara uji deteksi *Pseudomonas aeruginosa*

A.1 Prinsip

Langkah pertama yang dilakukan adalah pengayaan dengan menggunakan media kaldu non-selektif untuk meningkatkan jumlah mikroorganisme tanpa risiko penghambatan oleh bahan selektif yang ada pada media pertumbuhan selektif/diferensial.

Langkah kedua tes (isolasi) dilakukan pada media selektif diikuti dengan tes identifikasi.

Kemungkinan penghambatan pertumbuhan mikroba oleh sampel harus dinetralkan untuk memungkinkan pendeteksian dari mikroorganisme yang layak. Dalam semua kasus dan apapun metodologinya, netralisasi sifat antimikroba produk harus diperiksa dan ditunjukkan.

A.2 Pelarut dan media kultur

A.2.1 Umum

Instruksi umum diberikan dalam ISO 21148. Bila air disebutkan dalam standar ini, gunakan air suling atau air murni sebagaimana ditentukan dalam ISO 21148.

Kaldu pengayaan digunakan untuk menyebarkan sampel dan untuk meningkatkan populasi mikroba awal. Ini mungkin mengandung penetralisir jika spesimen yang diuji bersifat antimikroba. Efektivitas netralisasi harus ditunjukkan (lihat A.8). Informasi yang berkaitan dengan penetralisir yang sesuai diberikan dalam Lampiran D.

Kaldu pengayaan (lihat A.2.3.3.1) atau salah satu yang tercantum pada Lampiran E, cocok untuk memeriksa adanya *Pseudomonas aeruginosa* sesuai dengan standar ini jika telah ditunjukkan sesuai dengan pasal A.8.

Pelarut dan media kultur lainnya dapat digunakan jika telah ditunjukkan bahwa mereka cocok untuk digunakan.

A.2.2 Pelarut untuk suspensi bakteri (larutan tripton natrium klorida)

A.2.2.1 Umum

Pelarut digunakan untuk pembuatan suspensi bakteri yang digunakan untuk prosedur uji kesesuaian (lihat A.8).

A.2.2.2 Komposisi

- *tryptone, pancreatic digest of casein*	1,0 g
- natrium klorida	8,5 g
- air	1.000 ml

A.2.2.3 Persiapan

Larutkan komponen dalam air dengan mencampur sambil dipanaskan. Tempatkan pada wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,0 ± 0,2 bila diukur pada suhu kamar.

A.2.3 Media kultur

A.2.3.1 Umum

Media kultur dapat dibuat dengan menggunakan uraian yang diberikan di bawah atau dari media kultur dehidrasi sesuai petunjuk dari pabrik pembuatnya. Instruksi yang diberikan oleh pemasok media harus diikuti.

CATATAN Media siap pakai dapat digunakan saat komposisi dan/atau hasil kulturnya sebanding dengan formula yang diberikan berikut.

A.2.3.2 Media agar untuk uji kesesuaian (media *soybean–casein digest agar* (SCDA) atau *tryptic soy agar* (TSA))

A.2.3.2.1 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	15,0 g
- *papaic digest of soybean meal*	5,0 g
- natrium klorida	5,0 g
- agar	15,0 g
- air	1.000 ml

A.2.3.2.2 Persiapan

Larutkan komponen atau media lengkap dehidrasi ke dalam air dengan mencampur sambil dipanaskan. Tempatkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,3 ± 0,2 bila diukur di ruangan.

A.2.3.3 Kaldu pengayaan

A.2.3.3.1 Kaldu *Eugon* LT 100

A.2.3.3.1.1 Umum

Media ini mengandung bahan yang menetralisir zat penghambat yang ada dalam sampel : *lesitin* dan *polisorbat* 80, dan zat pendispersi : *octoxynol* 9.

A.2.3.3.1.2 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	15,0 g
- *papaic digest of soybean meal*	5,0 g
- L-sistin	0,7 g
- natrium klorida	4,0 g
- natrium sulfit	0,2 g
- glukosa	5,5 g

- lesitin telur 1,0 g
- polisorbat 80 5,0 g
- octoxynol 9 1,0 g
- air 1.000 ml

A.2.3.3.1.3 Persiapan

Larutkan komponen *polisorbat* 80, *oktoksinol* 9 dan *lesitin* telur secara berturut-turut ke dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan mencampur saat pemanasan. Keluarkan medium ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,0 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

A.2.3.3.2 Kaldu pengayaan lainnya

Kaldu pengayaan lainnya dapat digunakan sebagaimana mestinya (lihat Lampiran E).

A.2.3.4 Media agar selektif untuk isolasi *Pseudomonas aeruginosa*

A.2.3.4.1 Media agar Cetrimida

A.2.3.4.1.1 Komposisi

- *pancreatic digest of gelatin* 20,0 g
- magnesium klorida 1,4 g
- kalium sulfat 10,0 g
- cetrimida (*cetyltrimethylammonium bromide*) 0,3 g
- agar 13,6 g
- gliserol 10,0 ml
- air 1.000 ml

A.2.3.4.1.2 Persiapan

Larutkan semua komponen padat di dalam air dan tambahkan gliserol. Panaskan, dengan sering diaduk, dan rebus selama 1 menit agar terjadi pembubaran.

Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

A.2.3.5 Media agar selektif untuk konfirmasi *Pseudomonas aeruginosa*

A.2.3.5.1 Media agar *pseudomonas* untuk deteksi *pyocyanin* (*Pseudomonas* agar P)

A.2.3.5.1.1 Komposisi

- *pancreatic digest of gelatin* 20,0 g
- magnesium klorida anhidrat 1,4 g
- kalium sulfat anhidrat 10,0 g
- agar 15,0 g
- gliserol 10,0 ml
- air 1.000 ml

A.2.3.5.1.2 Persiapan

Larutkan semua komponen padat di dalam air, dan tambahkan gliserol tersebut. Panaskan, dengan sering diaduk, dan rebus selama 1 menit.

Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

A.3 Peralatan

Gunakan peralatan laboratorium seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148.

A.4 Strain mikroorganisme

Untuk verifikasi kesesuaian kondisi uji, strain perwakilan berikut digunakan :

Pseudomonas aeruginosa ATCC[1)] 9027 (strain setara : CIP[2)] 82118 atau NCIMB[3)] 8626 atau NBRC[4)] 13275 atau KCTC[5)] 2513 atau koleksi strain nasional setara lainnya).

Kultur sebaiknya dilarutkan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh pemasok strain referensi.

Strain tersebut dapat disimpan di laboratorium sesuai dengan EN 12353.

A.5 Penanganan produk dan sampel laboratorium

Jika perlu, simpan produk yang akan diuji pada suhu ruangan.

Jangan menginkubasi, mendinginkan atau membekukan produk dan sampel sebelum atau sesudah analisis.

Pengambilan sampel produk yang akan dianalisis sebaiknya dilakukan seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148. Analisis sampel seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148 dan sesuai prosedur pada pasal A.6.

A.6 Prosedur

A.6.1 Rekomendasi umum

Gunakan bahan steril, peralatan dan teknik aseptik untuk menyiapkan sampel, suspensi dan pengenceran awal. Dalam hal persiapan suspensi awal dalam zat pelarut yang sesuai, waktu yang digunakan antara akhir persiapan dan saat inokulum bersentuhan dengan kaldu

---

1) ATCC = American Type Culture Collection.
2) CIP = Institut Pasteur Collection.
3) NCIMB = National Collection of Industrial and Marine Bacteria.
4) NBRC = National Biological Resource center.
5) KCTC = Korean Collection for type culture.

pengayaan tidak boleh melebihi 45 menit, kecuali disebutkan secara khusus dalam petunjuk yang telah ditetapkan atau dokumen.

A.6.2 Penyiapan suspensi awal dalam kaldu pengayaan

A.6.2.1 Umum

Pengayaan disiapkan dari sampel sekurang-kurangnya 1 g atau 1 ml produk campuran yang diuji, yang terdispersi setidaknya 9 ml kaldu pengayaan.

CATATAN S adalah berat atau volume sebenarnya dari sampel.

Metode ini harus diperiksa untuk memastikan komposisi (penetralisir akhirnya ditambahkan) dan volume kaldu bekerja dengan optimal.

CATATAN Dalam beberapa kasus, dan bila memungkinkan, penyaringan produk melalui membran yang kemudian direndam dalam kaldu pengayaan, memudahkan netralisasi sifat antimikroba produk.

A.6.2.2 Produk yang dapat larut dalam air

Pindahkan sampel S produk ke wadah yang sesuai yang mengandung volume kaldu yang sesuai.

A.6.2.3 Produk yang tidak larut dalam air

Pindahkan sampel S produk ke wadah yang sesuai yang mengandung sejumlah zat pelarut yang sesuai (misalnya *Polisorbat* 80).

Campurkan sampel ke dalam zat pelarut dan tambahkan volume kaldu yang sesuai.

A.6.2.4 Produk yang dapat disaring

Gunakan saringan membran yang memiliki ukuran pori nominal tidak lebih dari 0,45 µm.

Pindahkan sampel S ke membran di peralatan penyaringan. Saring segera dan bersihkan membran dengan menggunakan volume air dan/atau pelarut yang ditentukan.

Pindahkan dan rendam membran ke dalam tabung atau labu dengan ukuran yang sesuai yang mengandung volume kaldu yang sesuai.

A.6.3 Inkubasi kaldu pengayaan yang diinokulasi

Inkubasi suspensi awal yang disiapkan dalam kaldu pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C paling sedikit 20 jam (maksimum 72 jam).

A.6.4 Deteksi dan Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

A.6.4.1 Isolasi

Dengan menggunakan *loop* steril, seberangkan satu alikuot kaldu pengayaan inkubasi pada permukaan media agar Cetrimida untuk mendapatkan koloni terisolasi.

Balikkan cawan petri dan kemudian diinkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C paling sedikit 24 jam (maksimum 48 jam).

Periksa koloni karakteristik (lihat Tabel 3).

Tabel 3 - Karakteristik morfologi *Pseudomonas aeruginosa* pada media selektif

Media Selektif	Karakteristik morfologi koloni *Pseudomonas aeruginosa*
Media agar-agar Cetrimida	Pigmen kuning-hijau (*pyocyanin*), yang berfluoresensi di bawah sinar UV

A.6.4.2 Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

A.6.4.2.1 Umum

Lanjutkan ke tes berikut, untuk koloni tersangka yang diisolasi pada media agar cetrimida. Kehadiran *Pseudomonas aeruginosa* dapat dikonfirmasi dengan tes biokimia lain yang sesuai, kultur dan biokimia.

A.6.4.2.2 Pewarnaan Gram

Tes ini dijelaskan dalam ISO 21148.

Pseudomonas aeruginosa menunjukkan hasil Gram negatif bentuk batang.

A.6.4.2.3 Uji oksidase

Tes ini dijelaskan dalam ISO 21148.
Pseudomonas aeruginosa menunjukkan hasil uji oksidase positif.

A.6.4.2.4 Kultur pada media agar *Pseudomonas* untuk deteksi *pyocyanin*

Inokulasi permukaan media agar *Pseudomonas* untuk mendeteksi *pyocyanin* dengan tersangka koloni terisolasi tumbuh pada media agar cetrimida, sehingga koloni individu berkembang. Inkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C.

Periksa pertumbuhan bakteri setelah 24 jam, 48 jam dan 72 jam. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni yang dikelilingi oleh zona biru ke hijau karena pembentukan *pyocyanin* atau dengan zona merah ke coklat gelap akibat produksi pirokubin.

A.7 Ekspresi hasil (deteksi *Pseudomonas aeruginosa*)

Jika identifikasi koloni mengkonfirmasikan keberadaan spesies ini, hasilnya dapat dinyatakan sebagai berikut :

Adanya *Pseudomonas aeruginosa* dalam sampel S.

Jika tidak ada pertumbuhan setelah pengayaan diamati dan/atau jika identifikasi koloni tidak mengkonfirmasi keberadaan spesies ini, hasilnya dapat dinyatakan sebagai berikut :

Tidak adanya *Pseudomonas aeruginosa* dalam sampel S.

A.8 Netralisasi sifat antimikroba produk

A.8.1 Umum

Berbagai tes yang dijelaskan di bawah ini menunjukkan bahwa mikroorganisme dapat tumbuh dalam kondisi analisis.

A.8.2 Persiapan inokulum

Sebelum diujicobakan, inokulasi agar SCDA atau yang sesuai lainnya (non selektif, non-penetralisir) dengan *Pseudomonas aeruginosa*. Inkubasi cawan pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 18 jam sampai 24 jam.

Untuk memanen kultur menggunakan *loop* steril, garis permukaan kultur dan suspensikan kembali di dalam pelarut untuk mendapatkan suspensi yang dikalibrasi sekitar 1×10^8 CFU per ml (misalnya dengan menggunakan spektrofotometer).

Gunakan suspensi yang dikalibrasi dan pengencerannya dalam 2 jam.

A.8.3 Kesesuaian metode deteksi

A.8.3.1 Prosedur

A.8.3.1.1 Dalam tabung 9 ml pengencer, siapkan pengenceran suspensi yang dikalibrasi supaya didapatkan hitungan akhir antara 100 CFU dan 500 CFU per ml. Untuk menghitung konsentrasi akhir mikroorganisme yang layak dalam suspensi yang dikalibrasi yang diencerkan, transfer 1 ml suspensi ke dalam cawan petri dan tuangkan pada 15 ml sampai 20 ml media agar meleleh yang disimpan dalam *waterbath* tidak lebih dari 48 °C. Biarkan mengeras dan kemudian diinkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 20 jam sampai 24 jam.

A.8.3.1.2 Siapkan duplikat, suspensi awal dalam kondisi yang dipilih untuk pengujian (paling sedikit 1 g atau 1 ml produk yang diuji, sebutkan volume kaldu pengayaan) dalam tabung atau labu. Bila menggunakan filter metode filtrasi membran dalam rangkap dua minimal 1 ml produk yang diuji dan pindahkan setiap membran ke dalam tabung atau labu yang berisi kaldu pengayaan dalam kondisi yang dipilih untuk pengujian.

A.8.3.1.3 Masukkan secara aseptik, 0,1 ml suspensi yang dikalibrasi (A.8.3.1.1) dari mikroorganisme ke dalam satu tabung atau tabung (uji kesesuaian). Campur, lalu inkubasi tabung atau labu (uji kesesuaian dan non okulasi kontrol) pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 20 jam sampai 24 jam.

A.8.3.1.4 Lakukan isolasi untuk setiap tabung atau tabung (uji kesesuaian dan kontrol yang tidak diinokulasi). Menggunakan sebuah *loop* steril, *streak an aliquot* (kondisi yang sama seperti dalam pengujian) dari campuran yang diinkubasi ke permukaan dari cawan petri (diameter 85 mm sampai 100 mm) mengandung sekitar 15 ml sampai 20 ml media agar Cetrimida. Inkubasi lempeng pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 24 jam sampai 48 jam.

A.8.3.2 Interpretasi kesesuaian hasil uji

Periksa apakah suspensi dikalibrasi yang dikalibrasi (A.8.3.1.1) mengandung antara 100 CFU dan 500 CFU per ml.

Metode netralisasi dan deteksi divalidasi jika terjadi pertumbuhan khas *Pseudomonas aeruginosa* pada cawan uji dan tidak terjadi pertumbuhan pada cawan kontrol.

Ketika pertumbuhan terdeteksi pada cawan kontrol (produk yang terkontaminasi), metode netralisasi dan deteksi divalidasi jika *Pseudomonas aeruginosa* dipulihkan pada cawan uji validasi.

Kegagalan pertumbuhan pada cawan uji kesesuaian menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba masih ada dan memerlukan modifikasi kondisi metode ini dengan adanya peningkatan volume gizi kaldu, jumlah produk yang tersisa sama, atau dengan penggabungan jumlah yang cukup dari zat aktif dalam kaldu pengayaan, atau dengan kombinasi modifikasi yang sesuai sehingga memungkinkan adanya pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*.

Jika penggabungan agen inaktivasi yang sesuai dan peningkatan volume yang substansial dari kaldu masih belum memungkinkan, untuk memulihkan kultur yang layak seperti yang dijelaskan di atas, hal ini menunjukkan bahwa media tidak mungkin terkontaminasi dengan *Pseudomonas aeruginosa*.

A.9 Laporan uji

Laporan pengujian harus berisi informasi berikut :

a) referensi terhadap standar ini;
b) semua informasi yang diperlukan untuk identifikasi lengkap produk;
c) metode yang digunakan;
d) hasil yang diperoleh;
e) semua rincian operasi untuk persiapan suspensi awal;
f) deskripsi metode dengan penetralisir dan media yang digunakan;
g) demonstrasi kesesuaian metode, bahkan jika tes telah dilakukan secara terpisah;
h) setiap titik yang tidak disebutkan dalam standar ini, atau dianggap opsional, beserta rinciannya dari setiap insiden yang mungkin telah mempengaruhi hasilnya.

Lampiran B
(normatif)
Cara uji deteksi *Staphylococcus aureus*

B.1 Prinsip

Langkah pertama prosedurnya adalah melakukan pengayaan dengan menggunakan media kaldu non-selektif untuk meningkatkan jumlah mikroorganisme tanpa risiko penghambatan oleh bahan selektif yang ada pada media pertumbuhan selektif/diferensial.

Langkah kedua tes (isolasi) dilakukan pada media selektif diikuti dengan tes identifikasi.

Kemungkinan penghambatan pertumbuhan mikroba oleh sampel harus dinetralisir untuk memungkinkan deteksi mikroorganisme yang layak. Pada semua kasus atau apa pun metode yang digunakan, netralisasi sifat antimikroba produk harus diperiksa dan ditunjukkan.

B.2 Pelarut dan media kultur

B.2.1 Umum

Instruksi umum diberikan dalam ISO 21148. Bila air disebutkan dalam dokumen ini, gunakan air suling atau air dimurnikan seperti yang ditentukan dalam ISO 21148.

Kaldu pengayaan digunakan untuk menyebarkan sampel dan untuk meningkatkan populasi mikroba awal. Ini mungkin mengandung penetralisir jika spesimen yang diuji bersifat antimikroba. Efektivitas netralisasi harus ditunjukkan (lihat B.8). Informasi yang berkaitan dengan penetralisir yang sesuai diberikan dalam Lampiran D.

Kaldu pengayaan cocok untuk memeriksa keberadaan *Staphylococcus aureus* sesuai dengan standar ini menyatakan bahwa hal itu telah divalidasi sesuai dengan pasal B.8.

Pelarut dan media kultur lainnya dapat digunakan jika telah ditunjukkan bahwa mereka cocok untuk digunakan.

B.2.2 Pelarut untuk suspensi bakteri (larutan tripton natrium klorida)

B.2.2.1 Umum

Pelarut digunakan untuk pembuatan suspensi bakteri yang digunakan untuk prosedur uji kesesuaian (lihat B.8).

B.2.2.2 Komposisi

- *tryptone*, *pancreatic digest of casein*	1,0 g
- natrium klorida	8,5 g
- air	1.000 ml

B.2.2.3 Persiapan

Larutkan komponen dalam air dengan mencampur sambil dipanaskan. Tempatkan dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,0 ± 0,2 bila diukur pada suhu kamar.

B.2.3 Media kultur

B.2.3.1 Umum

Media kultur dapat dibuat dengan menggunakan uraian yang diberikan di bawah ini atau dari media kultur dehidrat sesuai petunjuk dari produsen. Instruksi yang diberikan oleh pemasok media harus diikuti.

CATATAN Media siap pakai dapat digunakan saat komposisi dan/atau hasil kulturnya sebanding dengan formula yang diberikan berikut.

B.2.3.2 Media agar untuk untuk uji kesesuaian (media *soybean–casein digest agar* (SCDA) atau *tryptic soy agar* (TSA))

B.2.3.2.1 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	15,0 g
- *papaic digest of soybean meal*	5,0 g
- natrium klorida	5,0 g
- agar	15,0 g
- air	1.000 ml

B.2.3.2.2 Persiapan

Larutkan komponen atau media dehidrasi lengkap di dalam air dengan mencampur sambil memanaskan.

Tempatkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,3 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

B.2.3.3 Kaldu pengayaan

B.2.3.3.1 Kaldu Eugon LT 100

B.2.3.3.1.1 Umum

Media ini mengandung bahan yang menetralisir zat penghambat yang ada dalam sampel : lesitin dan polisorbat 80, dan zat pendispersi : octoxynol 9.

B.2.3.3.1.2 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	15,0 g
- tepung kedelai *papaic*	5,0 g
- L-sistin	0,7 g
- natrium klorida	4,0 g
- natrium sulfit	0,2 g
- glukosa	5,5 g
- lesitin telur	1,0 g

- polisorbat 80 5,0 g
- octoxynol 9 1,0 g
- air 1.000 ml

B.2.3.3.1.3 Persiapan

Larutkan komponen, polisorbat 80, oktoksinol 9 dan lesitin telur secara berturut-turut ke dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan mencampur saat pemanasan. Tempatkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,0 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

B.2.3.3.2 Kaldu pengayaan lainnya

Kaldu pengayaan lainnya dapat digunakan sebagaimana mestinya (lihat Lampiran F).

B.2.3.4 Media agar selektif untuk isolasi *Staphylococcus aureus*

B.2.3.4.1 Media agar Baird Parker

B.2.3.4.1.1 Media dasar

B.2.3.4.1.1.1 Komposisi

- *pancreatic digest of casein* 10,0 g
- ekstrak *yeast* 1,0 g
- ekstrak daging 5,0 g
- natrium piruvat 10,0 g
- L-glisin 12,0 g
- litium klorida 5,0 g
- agar 12,0 g sampai 22,0 g (tergantung pada kekuatan gel agar)
- air sampai volume akhir 950 ml

B.2.3.4.1.1.2 Persiapan

Larutkan komponen atau dehidrasi lengkap ke dalam air mendidih. Pindahkan media dalam jumlah 100 ml ke botol atau botol dengan kapasitas yang sesuai. Sterilkan media dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

B.2.3.4.1.2 Larutan kalium tellurite

B.2.3.4.1.2.1 Komposisi

- kalium tellurite (K_2TeO_3) 1,0 g
- air 100 ml

B.2.3.4.1.2.2 Persiapan

Larutkan kalium tellurite seluruhnya ke dalam air dengan sedikit pemanasan.

Sterilisasi dengan filtrasi menggunakan membran ukuran pori 0,22 µm. Larutan dapat disimpan maksimal selama satu bulan pada suhu 3 °C ± 2 °C. Buang larutan jika terbentuk endapan putih.

Padatan sebaiknya mudah larut. Jika bahan putih yang tidak larut ada di dalam air, maka serbuk tersebut sebaiknya dibuang.

B.2.3.4.1.3 Emulsi kuning telur (konsentrasi sekitar 20 % atau menurut instruksi pabrik)

Jika persiapan komersial tidak tersedia, persiapkan media sebagai berikut.

Gunakan telur ayam segar, cangkangnya utuh. Bersihkan telur dengan sikat dengan menggunakan deterjen cair. Bilas di bawah air mengalir, lalu hancurkan kulitnya dengan merendamnya dalam etanol 70% (fraksi volume) selama 30 detik dan biarkan mengering di udara, atau dengan menyemprotnya dengan alkohol diikuti dengan sterilisasi nyala. Melanjutkan kondisi aseptik, diamkan setiap telur dan pisahkan kuning telur dari putihnya dengan mengulang pemindahan kuning telur ke setengah bagian cangkang ke setengah bagian cangkang lainnya. Tempatkan kuning telur di labu steril dan tambahkan empat kali volume air sterilnya. Campur dengan seksama. Panaskan campuran pada suhu 47 °C selama 2 jam dan biarkan selama 18 jam sampai 24 jam pada suhu 3 °C ± 2 °C untuk memungkinkan terbentuknya presipitat. Kumpulkan cairan supernatan secara aseptik dalam labu steril segar untuk digunakan.

Emulsi dapat disimpan pada suhu 3 °C ± 2 °C selama maksimum 72 jam.

B.2.3.4.1.4 Media lengkap

B.2.3.4.1.4.1 Komposisi

- media dasar (B.2.3.4.1.1)	100 ml
- larutan kalium tellurite (B.2.3.4.1.2)	1,0 ml
- emulsi kuning telur (B.2.3.4.1.3)	5,0 ml

B.2.3.4.1.4.2 Persiapan

Lelehkan media dasar (B.2.3.4.1.1) lalu dinginkan sampai kira-kira 47 °C. Tambahkan, di bawah kondisi aseptik, dua larutan lainnya (B.2.3.4.1.2 dan B.2.3.4.1.3), masing-masing sebelumnya dipanaskan pada suhu 47 °C, pencampuran dengan baik setelah setiap ditambahkan.

B.2.3.4.2 Media agar selektif lainnya

Media agar selektif lainnya dapat digunakan (lihat Lampiran F).

B.3 Peralatan

Gunakan peralatan laboratorium seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148.

B.4 Strain mikroorganisme

Untuk kesesuaian kondisi uji, strain perwakilan berikut digunakan :

Staphylococcus aureus ATCC 6538 (strain setara : CIP 4,83 atau NCIMB 9518) atau koleksi strain nasional setara lainnya.

Kultur sebaiknya dilarutkan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh pemasok strain referensi.

Strain dapat disimpan di laboratorium sesuai dengan EN 12353.

B.5 Penanganan produk dan sampel laboratorium

Jika perlu, simpan produk yang akan diuji pada suhu ruangan.

Jangan menginkubasi, mendinginkan atau membekukan produk dan sampel sebelum atau sesudah analisis.

Pengambilan sampel produk yang akan dianalisis sebaiknya dilakukan seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148. Analisis sampel seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148 dan sesuai prosedur berikut.

B.6 Prosedur

B.6.1 Rekomendasi umum

Gunakan bahan steril, peralatan dan teknik aseptik untuk menyiapkan sampel, suspensi dan pengenceran awal. Dalam hal pembuatan suspensi awal pada zat pelarut yang sesuai, waktu yang digunakan antara akhir persiapan dan saat inokulum bersentuhan dengan kaldu pengayaan tidak boleh melebihi 45 menit, kecuali disebutkan secara khusus dalam protokol yang telah ditetapkan atau dokumen.

B.6.2 Persiapan suspensi awal dalam kaldu pengayaan

B.6.2.1 Umum

Pengayaan disiapkan dari sampel sekurang-kurangnya 1 g atau 1 ml produk campuran yang diuji, yang terdispersi setidaknya 9 ml kaldu pengayaan.

CATATAN S adalah berat atau volume sebenarnya dari sampel.

Metode ini harus diperiksa untuk memastikan komposisi (penetralisir akhirnya ditambahkan) dan volume kaldu bekerja dengan optimal.

CATATAN Dalam beberapa kasus, dan bila memungkinkan, penyaringan produk melalui membran yang kemudian direndam dalam kaldu pengayaan, memudahkan netralisasi sifat antimikroba produk.

B.6.2.2 Produk yang dapat larut dalam air

Pindahkan sampel S produk ke wadah yang sesuai yang mengandung volume kaldu yang sesuai.

B.6.2.3 Produk yang tidak larut air

Pindahkan sampel S produk ke wadah yang sesuai yang mengandung sejumlah zat pelarut yang sesuai (misalnya *Polisorbat* 80).

Campurkan sampel ke dalam zat pelarut dan tambahkan volume kaldu yang sesuai.

B.6.2.4 Produk yang dapat disaring

Gunakan saringan membran yang memiliki ukuran pori nominal tidak lebih dari 0,45 µm.

Pindahkan sampel S ke membran di peralatan penyaringan. Saring segera dan bersihkan membran dengan menggunakan volume air dan/atau pelarut yang ditentukan.

Pindahkan dan rendam membran ke dalam tabung atau labu dengan ukuran yang sesuai yang mengandung volume kaldu yang sesuai.

B.6.3 Inkubasi kaldu pengayaan yang diinokulasi

Inkubasi suspensi awal yang disiapkan dalam kaldu pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C paling sedikit 20 jam (maksimum 72 jam).

B.6.4 Deteksi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus*

B.6.4.1 Isolasi

Dengan menggunakan *loop* steril, seberangkan satu alikuot kaldu pengayaan inkubasi pada permukaan media agar Baird Parker untuk mendapatkan koloni terisolasi.

Balikkan cawan petri dan kemudian diinkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C minimal 24 jam (maksimum 48 jam).

Periksa koloni karakteristik (lihat Tabel 4).

Tabel 4 - Karakteristik morfologi *Staphylococcus aureus* pada media selektif

Media Selektif	Karakteristik morfologi koloni *Staphylococcus aureus*
Media agar-agar Baird Parker	Hitam, koloni mengkilap, dikelilingi oleh zona yang jelas (2 mm sampai 5 mm)

B.6.4.2 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

B.6.4.2.1 Umum

Lanjutkan ke tes berikut, untuk koloni tersangka yang diisolasi pada media agar Baird Parker. Kehadiran *Staphylococcus aureus* dapat dikonfirmasi dengan tes biokimia lain yang sesuai, kultur dan biokimia.

B.6.4.2.2 Pewarnaan Gram

Tes ini dijelaskan dalam ISO 21148.

Staphylococcus aureus menunjukkan hasil Gram positif dengan bentuk *coccus*.

B.6.4.2.3 Uji katalase

Tes ini dijelaskan dalam ISO 21148.
Staphylococcus aureus menunjukkan hasil uji katalase positif.

B.6.4.2.4 Uji koagulase

Dengan *loop* inokulasi, pindahkan dengan baik yang mewakili koloni tersangka terisolasi dari permukaan media agar Baird Parker ke tabung steril, masing-masing mengandung 0,5 ml mamalia, lebih disukai kelinci atau kuda, plasma dengan atau tanpa aditif yang sesuai.

Inkubasi pada suhu 37 °C ± 2 °C dan periksa tabung pada jam 3 jam, 4 jam, 6 jam sampai 24 jam jika tidak terbentuk koagulasi dalam 6 jam, kecuali ditentukan lain oleh pabrikan. Koagulasi positif hanya muncul pada 24 jam, harus dikonfirmasi.

Uji kontrol secara bersamaan dengan koloni yang tersangka sesuai rekomendasi pabrikan.

Staphylococcus aureus menunjukkan hasil uji koagulase positif.

B.7 Ekspresi hasil (deteksi *Staphylococcus aureus*)

Jika identifikasi koloni mengkonfirmasikan adanya spesies ini, hasilnya dapat dinyatakan sebagai berikut :

Adanya *Staphylococcus aureus* pada sampel S.

Jika setelah diamati pengayaan, tidak ada pertumbuhan dan/atau jika identifikasi koloni tidak mengkonfirmasi adanya spesies ini, hasilnya dapat dinyatakan sebagai berikut :

Tidak adanya *Staphylococcus aureus* pada sampel S.

B.8 Netralisasi sifat anti mikroba produk

B.8.1 Umum

Berbagai tes yang dijelaskan di bawah ini menunjukkan bahwa mikroorganisme dapat tumbuh dalam kondisi analisis.

B.8.2 Persiapan inokulum

Sebelum diujicobakan, inokulasi agar SCDA atau yang sesuai lainnya (non selektif, non-penetralisir) dengan *Staphylococcus aureus*. Inkubasi cawan pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 18 jam sampai 24 jam.

Untuk memanen kultur menggunakan *loop* steril, garis permukaan kultur dan suspensikan kembali di dalam pelarut untuk mendapatkan suspensi yang dikalibrasi sekitar 1×10^{8} CFU per ml (misalnya dengan menggunakan spektrofotometer).

Gunakan suspensi yang dikalibrasi dan pengencerannya dalam 2 jam.

B.8.3 Kesesuaian metode deteksi

B.8.3.1 Prosedur

B.8.3.1.1 Dalam tabung 9 ml pengencer, siapkan pengenceran suspensi yang dikalibrasi supaya didapatkan hitungan akhir antara 100 CFU dan 500 CFU per ml. Untuk menghitung konsentrasi akhir mikroorganisme yang layak dalam suspensi yang dikalibrasi yang diencerkan, transfer 1 ml suspensi ke dalam cawan petri dan tuangkan pada 15 ml sampai 20 ml media agar meleleh yang disimpan dalam *waterbath* tidak lebih dari 48 °C. Biarkan mengeras dan kemudian diinkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 20 jam sampai 24 jam.

B.8.3.1.2 Siapkan duplikat, suspensi awal dalam kondisi yang dipilih untuk pengujian (paling sedikit 1 g atau 1 ml produk yang diuji, sebutkan volume kaldu pengayaan) dalam tabung atau labu. Bila menggunakan filter metode filtrasi membran dalam rangkap dua minimal 1 ml produk yang diuji dan pindahkan setiap membran ke dalam tabung atau labu yang berisi kaldu pengayaan dalam kondisi yang dipilih untuk pengujian.

B.8.3.1.3 Masukkan secara aseptik, 0,1 ml suspensi yang dikalibrasi (B.8.3.1.1) dari mikroorganisme ke dalam satu tabung atau tabung (uji kesesuaian). Campur, lalu inkubasi tabung atau labu (uji kesesuaian dan non okulasi kontrol) pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 20 jam sampai 24 jam.

B.8.3.1.4 Lakukan isolasi untuk setiap tabung atau tabung (uji kesesuaian dan kontrol yang tidak diinokulasi). Menggunakan sebuah *loop* steril, *streak an aliquot* (kondisi yang sama seperti dalam pengujian) dari campuran yang diinkubasi ke permukaan dari cawan petri (diameter 85 mm sampai 100 mm) mengandung sekitar 15 ml sampai 20 ml media agar Baird Parker. Inkubasi lempeng pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 24 jam sampai 48 jam.

B.8.3.2 Interpretasi kesesuaian hasil uji

Periksa apakah suspensi terkalibrasi yang dikalibrasi (B.8.3.1.1) mengandung antara 100 CFU per ml dan 500 CFU per ml.

Metode netralisasi dan deteksi divalidasi jika terjadi pertumbuhan khas *Staphylococcus aureus* pada cawan uji dan tidak terjadi pertumbuhan pada cawan kontrol.

Ketika pertumbuhan terdeteksi pada cawan kontrol (produk yang terkontaminasi), metode netralisasi dan deteksi divalidasi jika *Staphylococcus aureus* dipulihkan pada cawan uji validasi.

Kegagalan pertumbuhan pada cawan uji kesesuaian menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba masih ada dan memerlukan modifikasi kondisi metode ini dengan adanya peningkatan volume gizi kaldu, jumlah produk yang tersisa sama, atau dengan penggabungan jumlah yang cukup dari zat aktif dalam kaldu pengayaan, atau dengan kombinasi modifikasi yang sesuai sehingga memungkinkan adanya pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Jika penggabungan agen inaktivasi yang sesuai dan peningkatan volume yang substansial dari kaldu masih belum memungkinkan, untuk memulihkan kultur yang layak seperti yang dijelaskan di atas, hal ini menunjukkan bahwa media tidak mungkin terkontaminasi dengan *Staphylococcus aureus*.

B.9 Laporan uji

Laporan pengujian harus berisi informasi berikut :

i) referensi terhadap standar ini;
j) semua informasi yang diperlukan untuk identifikasi lengkap produk;
k) metode yang digunakan;
l) hasil yang diperoleh;
m) semua rincian operasi untuk persiapan suspensi awal;
n) deskripsi metode dengan penetralisir dan media yang digunakan;
o) demonstrasi kesesuaian metode, bahkan jika tes telah dilakukan secara terpisah;
p) setiap titik yang tidak disebutkan dalam standar ini, atau dianggap opsional, beserta rinciannya dari setiap insiden yang mungkin telah mempengaruhi hasilnya.

Lampiran C
(normatif)
Cara uji deteksi *Candida albicans*

C.1 Prinsip

Langkah pertama prosedurnya adalah melakukan pengayaan dengan menggunakan media kaldu non-selektif untuk meningkatkan jumlah mikroorganisme tanpa risiko penghambatan oleh bahan selektif yang ada pada media pertumbuhan selektif/diferensial.

Langkah kedua tes (isolasi) dilakukan pada media selektif diikuti dengan tes identifikasi.

Kemungkinan penghambatan pertumbuhan mikroba oleh sampel harus dinetralisir untuk memungkinkan deteksi mikroorganisme yang layak. Pada semua kasus atau apa pun metode yang digunakan, netralisasi sifat antimikroba produk harus diperiksa dan ditunjukkan.

C.2 Pelarut dan media kultur

C.2.1 Umum

Instruksi umum diberikan dalam ISO 21148. Bila air disebutkan dalam dokumen ini, gunakan air suling atau air dimurnikan seperti yang ditentukan dalam ISO 21148.

Kaldu pengayaan digunakan untuk menyebarkan sampel dan untuk meningkatkan populasi mikroba awal. Ini mungkin mengandung penetralisir jika spesimen yang diuji bersifat antimikroba. Efektivitas netralisasi harus ditunjukkan (lihat C.8). Informasi yang berkaitan dengan penetralisir yang sesuai diberikan dalam Lampiran D.

Kaldu pengayaan cocok untuk memeriksa keberadaan *Candida albicans* sesuai dengan standar ini menyatakan bahwa hal itu telah divalidasi sesuai dengan pasal C.8.

Pelarut dan media kultur lainnya dapat digunakan jika telah ditunjukkan bahwa mereka cocok untuk digunakan.

C.2.2 Pelarut untuk suspensi *yeast* (larutan tripton natrium klorida)

C.2.2.1 Umum

Pelarut digunakan untuk persiapan suspensi *yeast* yang digunakan untuk kesesuaian prosedur uji (lihat C.8).

C.2.2.2 Komposisi

- *tryptone*, *pancreatic digest of casein*	1,0 g
- natrium klorida	8,5 g
- air	1.000 ml

C.2.2.3 Persiapan

Larutkan komponen dalam air dengan mencampur sambal dipanaskan. Tempatkan dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,0 ± 0,2 bila diukur pada suhu kamar.

C.2.3 Kultur media

C.2.3.1 Umum

Media kultur dapat dibuat dengan menggunakan uraian yang diberikan di bawah ini atau dari media kultur dehidrat sesuai petunjuk dari produsen. Instruksi yang diberikan oleh pemasok media harus diikuti.

CATATAN Media siap pakai dapat digunakan saat komposisi dan/atau hasil kulturnya sebanding dengan formula yang diberikan berikut.

C.2.3.2 Media agar untuk uji kesesuaian (lihat pasal C.8)

C.2.3.2.1 *Sabreaud dextrose agar* (SDA)

C.2.3.2.1.1 Komposisi

- dekstrosa	40,0 g
- *peptic digest of animal tissue*	5,0 g
- *pancreatic digest of casein*	5,0 g
- agar	15,0 g
- air	1.000 ml

C.2.3.2.1.2 Persiapan

Larutkan komponen atau media dehidrasi lengkap ke dalam air dengan mencampur sambil dipanaskan. Tempatkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, pH harus setara dengan 5,6 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

C.2.3.2.2 Media agar lain untuk uji kesesuaian

Media agar lainnya untuk uji kesesuaian dapat digunakan sebagaimana mestinya (lihat Lampiran G).

C.2.3.3 Pengayaan kaldu

C.2.3.3.1 Kaldu Eugon LT 100

C.2.3.3.1.1 Umum

Media ini mengandung bahan yang menetralisir zat penghambat yang ada di dalam sampel : lesitin dan polisorbat 80, dan zat pendispersi oktoksinol 9.

C.2.3.3.1.2 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	15,0 g
- *papaic digest of soybean meal*	5,0 g
- L-sistin	0,7 g
- natrium klorida	4,0 g
- natrium sulfit	0,2 g

-	glukosa	5,5 g
-	lesitin telur	1,0 g
-	polisorbat 80	5,0 g
-	octoxynol 9	1,0 g
-	air	1.000 ml

C.2.3.3.1.3 Persiapan

Larutkan komponen polisorbat 80, octoxynol 9 dan lesitin telur secara berturut-turut ke dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan mencampur saat pemanasan. Tempatkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan larutan, pH harus setara dengan 7,0 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

C.2.3.3.2 Kaldu pengayaan lainnya

Kaldu pengayaan lainnya dapat digunakan sebagaimana mestinya (lihat Lampiran G).

C.2.3.4 Media agar selektif untuk isolasi *Candida albicans*

C.2.3.4.1 Agar sabouraud dekstrosa kloramfenikol

C.2.3.4.1.1 Komposisi

-	dekstrosa	40,0 g
-	*peptic digest of animal tissue*	5,0 g
-	*pancreatic digest of casein*	5,0 g
-	kloramfenikol	0,050 g
-	agar	15,0 g
-	air	1.000 ml

C.2.3.4.1.2 Persiapan

Larutkan komponen (termasuk kloramfenikol) atau media dehidrasi lengkap di dalam air dengan mencampur sambil dipanaskan. Tempatkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi pH harus setara dengan 5,6 ± 0,2 bila diukur di ruangan suhu.

C.2.3.4.2 Media agar selektif lainnya

Media agar selektif lainnya dapat digunakan sebagaimana mestinya (lihat Lampiran G).

C.2.3.5 Agar *corn meal* dengan 1 % polisorbat 80

C.2.3.5.1 Komposisi

-	infus dari tepung jagung	50,0 g
-	agar	15,0 g
-	polisorbat 80	10,0 g
-	air	1.000 ml

C.2.3.5.2 Persiapan

Larutkan komponen atau media dehidrasi lengkap ke dalam air dengan mencampur sambal dipanaskan. Tempatkan media ke dalam wadah yang sesuai. Sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi pH harus setara dengan 6,0 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

C.3 Peralatan

Gunakan peralatan laboratorium seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148.

C.4 Strain mikroorganisme

Untuk verifikasi kondisi uji kesesuaian, strain perwakilan berikut dapat digunakan :

Candida albicans ATCC 10231 atau strain setara : IP[6)] 48.72 atau NCPF[7)] 3179 atau NBRC 1594 atau KCTC 17205, atau koleksi strain nasional lainnya yang setara.

Kultur sebaiknya dilarutkan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh pemasok strain referensi.

Strain tersebut dapat disimpan di laboratorium sesuai dengan EN 12353.

C.5 Penanganan produk dan sampel laboratorium

Jika perlu, simpan produk yang akan diuji pada suhu kamar.

Jangan menginkubasi, mendinginkan atau membekukan produk dan sampel sebelum atau sesudah analisis.

Pengambilan sampel produk yang akan dianalisis sebaiknya dilakukan seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148. Analisis sampel seperti yang dijelaskan dalam ISO 21148 dan sesuai prosedur berikut.

C.6 Prosedur

C.6.1 Rekomendasi umum

Gunakan bahan steril, peralatan dan teknik aseptik untuk menyiapkan sampel, suspensi dan pengenceran awal. Dalam hal pembuatan suspensi awal pada zat pelarut yang sesuai, waktu yang digunakan antara akhir persiapan dan saat inokulum bersentuhan dengan kaldu pengayaan tidak boleh melebihi 45 menit, kecuali disebutkan secara khusus dalam protokol yang telah ditetapkan atau dokumen.

---

6) Institute Pasteur
7) National Collection of Pathogenic Fungi

C.6.2 Persiapan suspensi awal dalam kaldu pengayaan

C.6.2.1 Umum

Pengayaan disiapkan dari sampel sekurang-kurangnya 1 g atau 1 ml produk campuran yang uji, yang terdispresi setidaknya 9 ml kaldu pengayaan.

CATATAN S adalah berat atau volume sebenarnya dari sampel.

Metode ini harus diperiksa untuk memastikan komposisi (penetralisir akhirnya ditambahkan) dan volume kaldu bekerja dengan optimal.

CATATAN Dalam beberapa kasus, dan bila memungkinkan, penyaringan produk melalui membran yang kemudian direndam dalam kaldu pengayaan, memudahkan netralisasi sifat antimikroba produk.

C.6.2.2 Produk yang dapat larut dalam air

Pindahkan sampel S produk ke wadah yang sesuai yang mengandung volume kaldu yang sesuai.

C.6.2.3 Produk yang tidak larut air

Pindahkan sampel S produk ke wadah yang sesuai yang mengandung sejumlah zat pelarut yang sesuai (misalnya *Polisorbat* 80).

Campurkan sampel ke dalam zat pelarut dan tambahkan volume kaldu yang sesuai.

C.6.2.4 Produk yang dapat disaring

Gunakan saringan membran yang memiliki ukuran pori nominal tidak lebih dari 0,45 μm.

Pindahkan sampel S ke membran di peralatan penyaringan (lihat ISO 21148). Saring segera dan bersihkan membran dengan menggunakan volume air dan/atau pelarut yang ditentukan.

Pindahkan dan rendam membran ke dalam tabung atau labu dengan ukuran yang sesuai yang mengandung volume kaldu yang sesuai.

C.6.3 Inkubasi kaldu pengayaan yang diinokulasi

Inkubasi suspensi awal yang disiapkan dalam kaldu pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C paling sedikit 20 jam (maksimum 72 jam).

C.6.4 Deteksi dan identifikasi *Candida albicans*

C.6.4.1 Isolasi

Dengan menggunakan *loop* steril, seberangkan satu alikuot kaldu pengayaan inkubasi pada permukaan media agar Sabouraud dextrose kloramfenikol untuk mendapatkan koloni terisolasi.

Balikkan cawan petri dan kemudian diinkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 24 jam sampai maksimum 48 jam.

Periksa koloni karakteristik (lihat Tabel 5).

Tabel 5 - Karakteristik morfologi *Candida albicans* pada media selektif

Media Selektif	Karakteristik morfologi koloni *Candida albicans*
Agar sabouraud dekstrosa kloramfenikol	Putih sampai krem, lembut dan cembung

C.6.4.2 Identifikasi *Candida albicans*

C.6.4.2.1 Umum

Candida albicans bisa tampak dimorfis dan mampu menghasilkan *pseudohyphae*, beberapa hifa sejati, dan kelompok *blastoconidia* bulat serta *chlamydospora* berdinding tebal besar. Pada suhu lingkungan yang rendah, bisa terlihat bentuk *pseudo-mycelial* ini; Namun, itu bisa berubah menjadi bentuk uniseluler pada suhu yang lebih tinggi.

Lanjutkan ke tes berikut untuk koloni tersangka yang diisolasi pada media sabouraud dekstrosa kloramfenikol. Kehadiran *Candida albicans* dapat dikonfirmasi dengan tes biokimia lain yang sesuai, kultur dan biokimia.

C.6.4.2.2 Pewarnaan Gram

Tes ini dijelaskan dalam ISO 21148.

Observasi mikroskopis harus menunjukkan warna ungu, sel telur pendek atau memanjang, kadang dengan sel tunas.

C.6.4.2.3 Produksi *germ tube*

C.6.4.2.3.1 Tempatkan 0,5 ml sampai 1 ml serum (serum betis janin atau kuda) di tabung tes kecil.

C.6.4.2.3.2 Emulsi sebagian kecil koloni *yeast* untuk diuji dalam serum.

C.6.4.2.3.3 Inkubasi dalam rendaman air, pada suhu 37 °C ± 1 °C, selama 1,5 jam sampai 2 jam, atau dalam inkubator pada suhu 37 °C ± 2 °C selama 3 jam.

C.6.4.2.3.4 Tempatkan setetes serum pada *slide*, pasang *coverglass* dan periksa secara mikroskopis untuk produksi *germ tube*.

Germ tube muncul sebagai filamen silindris yang berasal dari *blastospora*, tanpa penyempitan pada titik asal dan tanpa pembengkakan yang jelas sepanjang filamen.

Pembentukan *germ tube* menandakan adanya *Candida albicans*.

Jika *germ tube* tidak terbentuk, koloni harus diperiksa untuk produksi hifa, *pseudohyphae* dan *chlamydospores* sesuai dengan C.6.4.2.4.

C.6.4.2.4 Kultur pada *corn meal* agar dengan 1% polisorbat 80

C.6.4.2.4.1 Pindahkan sebagian kecil koloni *yeast* dengan kawat inokulasi dan garis inokulasi pada permukaan media di tengah cawan. Tempatkan *coverglass* steril di atas garis inokulum.

C.6.4.2.4.2 Inkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 3 hari.

C.6.4.2.4.3 Setelah 24 jam, lepaskan tutup cawan dan periksa pertumbuhannya melalui *coverglass* di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 × sampai 400 ×.

Candida albicans menghasilkan *chlamydospore* berdinding besar, sangat refraktori, berdinding tebal yang mungkin terlihat atau di cabang lateral pendek.

C.7 Ekspresi hasil (deteksi *Candida albicans*)

Jika identifikasi koloni mengkonfirmasikan adanya spesies ini, hasilnya dapat dinyatakan sebagai berikut :

Adanya *Candida albicans* pada sampel S.

Jika setelah diamati pengayaan, tidak ada pertumbuhan dan/atau jika identifikasi koloni tidak mengkonfirmasi adanya spesies ini, hasilnya dapat dinyatakan sebagai berikut :

Tidak adanya *Candida albicans* pada sampel S.

C.8 Netralisasi sifat antimikroba produk

C.8.1 Umum

Berbagai tes yang dijelaskan di bawah ini menunjukkan bahwa mikroorganisme dapat tumbuh dalam kondisi analisis.

C.8.2 Persiapan inokulum

Sebelum diujicobakan, inokulasi permukaan agar soybean casein digest (SCDA) atau yang sesuai lainnya (nonselektif, non-penetralisir) dengan *Candida albicans*. Inkubasi cawan pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 18 jam sampai 24 jam.

Untuk memanen kultur menggunakan *loop* steril, garis-garis permukaan kultur dan garis permukaan kultur dan suspensikan kembali di dalam pelarut untuk mendapatkan suspensi yang dikalibrasi sekitar 1×10^6 CFU per ml (misalnya dengan menggunakan spektrofotometer).

Gunakan suspensi yang dikalibrasi dan pengencerannya dalam 2 jam.

C.8.3 Kesesuaian metode deteksi

C.8.3.1 Prosedur

C.8.3.1.1 Dalam tabung 9 ml pelarut, siapkan pengenceran suspensi yang dikalibrasi agar didapatkan hitungan akhir antara 100 CFU dan 500 CFU per ml. Untuk menghitung konsentrasi mikroorganisme akhir yang hidup di dalam suspensi yang terkalibrasi, pindahkan

1 ml suspensi ke dalam cawan petri dan tuangkan 15 ml sampai 20 ml pada media agar meleleh yang disimpan dalam rendaman air tidak lebih dari 48 °C. Diamkan mengeras kemudian diinkubasi pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 20 jam sampai 24 jam.

C.8.3.1.2 Siapkan duplikat, suspensi awal pada kondisi yang dipilih untuk pengujian (paling sedikit 1 g atau 1 ml dari produk yang diuji, volume kaldu pengayaan yang ditetapkan) dalam tabung atau labu. Bila menggunakan filter filtrasi metode membran dalam rangkap dua minimal 1 ml produk yang diuji dan dipindahkan masing-masing membran ke dalam tabung atau tabung berisi kaldu pengayaan dalam kondisi yang dipilih untuk pengujian.

C.8.3.1.3 Lakukan secara aseptik, 0,1 ml suspensi dikalibrasi (C.8.3.1.1) dari mikroorganisme ke dalam satu tabung atau tabung (uji kesesuaian). Campur, lalu inkubasi kedua tabung atau labu (kontrol uji kesesuaian dan non-inokulasi) pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 20 jam sampai 24 jam.

C.8.3.1.4 Lakukan isolasi untuk setiap tabung atau tabung (kontrol uji kesesuaian dan yang tidak diinokulasi). Gunakan sebuah *loop* steril, garis aliquot (kondisi yang sama seperti dalam pengujian) dari campuran yang diinkubasi ke permukaan dari cawan petri (berdiameter 85 mm sampai 100 mm) mengandung sekitar 15 ml sampai 20 ml media sabouraud dekstrosa kloramfenikol. Inkubasi cawan pada suhu 32,5 °C ± 2,5 °C selama 24 jam sampai 48 jam.

C.8.3.2 Interpretasi hasil uji kesesuaian

Periksa apakah suspensi yang dikalibrasi (C.8.3.1.1) mengandung antara 100 CFU dan 500 CFU per ml.

Netralisasi diverifikasi dan metode pendeteksiannya dipastikan bahwa karakteristik pertumbuhannya *Candida albicans* terjadi pada cawan uji kesesuaian dan tidak terjadi pertumbuhan pada cawan kontrol.

Ketika pertumbuhan terdeteksi pada cawan kontrol (produk yang terkontaminasi), netralisasi diverifikasi dan metode pendeteksiannya dipastikan bahwa *Candida albicans* ditemukan kembali pada cawan uji kesesuaian.

Kegagalan pertumbuhan pada cawan uji kesesuaian menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba masih ada dan memerlukan modifikasi kondisi metode ini dengan adanya peningkatan volume gizi kaldu, jumlah produk yang tersisa sama, atau dengan penggabungan jumlah yang cukup dari zat aktif dalam kaldu pengayaan, atau dengan kombinasi modifikasi yang sesuai sehingga memungkinkan adanya pertumbuhan *Candida albicans*.

Jika penggabungan agen inaktivasi yang sesuai dan peningkatan volume yang substansial dari kaldu masih belum memungkinkan, untuk memulihkan kultur yang layak seperti yang dijelaskan di atas, hal ini menunjukkan bahwa media tidak mungkin terkontaminasi dengan *Candida albicans*.

C.9 Laporan uji

Laporan pengujian harus menyebutkan informasi berikut :

a) referensi terhadap standar ini;
b) semua informasi yang diperlukan untuk identifikasi lengkap produk;
c) metode yang digunakan;

d) hasil yang diperoleh;
e) semua rincian operasi untuk persiapan suspensi awal;
f) deskripsi metode dengan penetralisir dan media yang digunakan;
g) demonstrasi kesesuaian metode, bahkan jika tes telah dilakukan secara terpisah;
h) setiap titik yang tidak disebutkan dalam standar ini, atau dianggap opsional, beserta rinciannya dari setiap insiden yang mungkin telah mempengaruhi hasilnya.

Lampiran D
(informatif)
Penetralisir aktivitas antimikroba pengawet dan cairan pembilasan

Tabel 6 - Penetralisir aktivitas antimikroba pengawet dan cairan pembilasan

Bahan Pengawet	Senyawa kimia mampu menetralisir bahan pengawet aktivitas antimikroba	Contoh penetralisir yang sesuai dan cairan pencuci (untuk metode filtrasi membran)
Senyawa fenolik: paraben, fenoksietanol, feniloksin, anilida dll	Lesitin, polisorbat 80, etilen oksida kondensat alkohol lemak, non-ionik surfaktan	Polisorbat 80, 30 g / l + lesitin, 3 g / l. Kondensat etilen oksida alkohol lemak, 7 g / l + lesitin, 20 g / l + polisorbat 80, 4 g / l. Kaldu penetralisir D/E (lihat Lampiran E) Cairan pencuci: air suling; tryptone, 1 g / l + NaCl, 9 g / l; polisorbat 80, 5 g / l.
Amonium kuarter senyawa, surfaktan kationik	Lecithin, saponin, polisorbat 80, Sodium dodesil sulfat, Kondensat etilen oksida dari lemak alkohol	Polisorbat 80, 30 g / l + natrium dodecyl sulfat, 4 g / l + lesitin, 3 g / l. Polisorbat 80, 30 g / l + saponin, 30 g / l + lesitin, 3 g / l. Kaldu penetralisir D/E (lihat Lampiran E) Cairan pencuci: air suling; tryptone, 1 g / l + NaCl, 9 g / l; polisorbat 80, 5 g / l.
Aldehida, formaldehida-agen pelepasan	Glisin, histidin	Lesitin, 3 g / l + polisorbat 80, 30 g / l + L-histidin, 1 g / l + . Polisorbat 80, 30 g / l + saponin, 30 g / l + L-histidin, 1 g / l + L-sistin, 1 g/l. Kaldu penetralisir D/E (lihat Lampiran E) Cairan pencuci: polisorbat 80, 30 g / l + L-histidin, 0,5 g / l.
Senyawa pengoksidasi	Natrium tiosulfat	Natrium tiosulfat, 5 g/l. Cairan pencuci: natrium tiosulfat, 3 g / l.
Isotiazolinon, imidazol	Lesitin, saponin, *amines*, sulfat, *mercaptans*, natrium bisulfit, natrium tioglikolat	Polisorbat 80, 30 g / l + saponin, 30 g / l + lesitin, 3 g/l. Cairan pencuci: tripton, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; polisorbat 80, 5 g/l.
Biguanides	Lesitin, saponin, polisorbat 80	Polisorbat 80, 30 g / l + saponin, 30 g / l + lesitin, 3 g/l. Cairan pencuci: tripton, 1 g/l + NaCl, 9 g/l; polisorbat 80, 5 g/l.
Garam metalik (Cu, Zn, Hg), senyawa organo-mercurik	Natrium bisulfat, L-sistin senyawa sulfhidril, tiroksilat AC id,	Natrium tioglikolat, 0,5 g/l atau 5 g/l. L-sistin, 0,8 g/l atau 1,5 g/l. Kaldu penetralisir D/E (lihat Lampiran E) Cairan pencuci: Natrium tioglikolat, 0,5 g/l.

Lampiran E
(informatif)
Kaldu pengayaan lainnya

E.1 Media Soybean-casein-digest-lesitin-polisorbat 80 (kaldu SCDLP 80)

E.1.1 Komposisi

- kasein pepton	17,0 g
- soybean peptone	3,0 g
- natrium klorida	5,0 g
- kalium hidrogen fosfat	2,5 g
- glukosa	2,5 g
- lesitin	1,0 g
- polisorbat 80	7,0 g
- air	1.000 ml

E.1.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut (atau media dehidrat lengkap) satu per satu dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

E.2 Kaldu penetralisir D/E (*Dey/Engley neutralizing broth*)

E.2.1 Komposisi

- glukosa	10,0 g
- *soybean* lesitin	7,0 g
- natrium tiosulfat pentahidrat	6,0 g
- polisorbat 80	5,0 g
- *pancreatic digest of casein*	5,0 g
- natrium bisulfit	2,5 g
- ekstrak *yeast*	2,5 g
- natrium tioglikolat	1,0 g

E.2.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut (atau media dehidrasi lengkap) satu per satu dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

E.3 Kaldu modified letheen

E.3.1 Komposisi

-	*peptic digest of meat*	20,0 g
-	*pancreatic digest of casein*	5,0 g
-	ekstrak *beef*	5,0 g
-	ekstrak *yeast*	2,0 g
-	lesitin	0,7 g
-	polisorbat 80	5,0 g
-	natrium klorida	5,0 g
-	natrium bisulfit	0,1 g
-	air	1.000 ml

E.3.2 Persiapan

Larutkan secara berturut-turut dalam air mendidih : polisorbat 80 dan lesitin sampai tercampur sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan mencampur selama pemanasan. Aduk perlahan untuk menghindari terbentuknya busa. Tempatkan media dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 $\pm$ 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

Lampiran F
(informatif)
Media lainnya untuk deteksi *Staphylococcus aureus*

F.1 Kaldu pengayaan lainnya

F.1.1 Media cair *soybean-casein digest*

F.1.1.1 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	15,0 g
- papaic digest of soybean meal	5,0 g
- natrium klorida	5,0 g
- air	1.000 ml

F.1.1.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut atau media dehidrasi lengkap satu per satu dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

F.1.2 Kaldu penetralisir D/E (*Dey/Engley neutralizing broth*)

F.1.2.1 Komposisi

- glukosa	10,0 g
- *soybean* lesitin	7,0 g
- natrium tiosulfat pentahidrat	6,0 g
- polisorbat 80	5,0 g
- *pancreatic digest of casein*	5,0 g
- natrium bisulfit	2,5 g
- ekstrak *yeast*	2,5 g
- natrium tioglikolat	1,0 g
- *bromocresol purple*	0,02 g
- air	1.000 ml

F.1.2.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut (atau media dehidrat lengkap) satu per satu dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

F.1.3 Kaldu *modified letheen*

F.1.3.1 Komposisi

- *peptic digest of meat*	20,0 g
- *pancreatic digest of casein*	5,0 g
- ekstrak *beef*	5,0 g
- ekstrak *yeast*	2,0 g
- lesitin	0,7 g
- polisorbat 80	5,0 g
- natrium klorida	5,0 g
- natrium bisulfit	0,1 g
- air	1.000 ml

F.1.3.2 Persiapan

Larutkan secara berturut-turut dalam air mendidih : polisorbat 80 dan lesitin sampai tercampur sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan mencampur selama pemanasan. Aduk perlahan untuk menghindari terbentuknya busa. Tempatkan media dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

F.2 Media agar selektif

F.2.1 Media agar mannitol-salt (agar Chapman)

F.2.1.1 Komposisi

- ekstrak *beef*	1,0 g
- *pancreatic digest of casein*	5,0 g
- *pancreatic digest* of *beef*	5,0 g
- natrium klorida	75,0 g
- D-mannitol	10,0 g
- agar	15,0 g
- *phenol red*	0,025 g
- air	1.000 ml

F.2.1.2 Persiapan

Campurkan lalu panaskan dengan agitasi, dan rebus selama 1 menit untuk pencampuran. Tempatkan pada tempat yang sesuai dan disterilkan.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

F.2.2 Media agar Vogel-Johnson

F.2.2.1 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	10,0 g
- ekstrak *yeast*	5,0 g
- mannitol	10,0 g

- kalium hidrogen fosfat 5,0 g
- litium klorida 5,0 g
- glisin 10,0 g
- agar 16,0 g
- *phenol red* 0,025 g
- air 1.000 ml

F.2.2.2 Persiapan

Didihkan larutan yang mengandung padatan selama 1 menit. Sterilkan, lalu dinginkan antara 45 °C dan 50 °C dan ditambahkan 20 ml larutan kalium tellurit steril.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 $\pm$ 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

Lampiran G
(informatif)
Media lainnya untuk deteksi *Candida albicans*

G.1 Kaldu pengaya lainnya

G.1.1 Media cair *soybean-casein-digest*

G.1.1.1 Komposisi

- *pancreatic digest of casein*	17,0 g
- *papaic digest of soybean meal*	3,0 g
- natrium klorida	5,0 g
- kalium hidrogen fosfat	2,5 g
- dekstrosa	2,5 g
- air	1.000 ml

G.1.1.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut atau media dehidrasi lengkap, dengan pemanasan jika diperlukan. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,3 $\pm$ 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

Tempatkan media pada wadah yang sesuai.

G.1.2 Kaldu *modified letheen*

G.1.2.1 Komposisi

- *peptic digest of meat*	20,0 g
- *pancreatic digest of casein*	5,0 g
- ekstrak *beef*	5,0 g
- ekstrak *yeast*	2,0 g
- lesitin	0,7 g
- polisorbat 80	5,0 g
- natrium klorida	5,0 g
- natrium bisulfit	0,1 g
- air	1.000 ml

G.1.2.2 Persiapan

Larutkan secara berturut-turut dalam air mendidih : polisorbat 80 dan lesitin sampai tercampur sempurna. Larutkan komponen lainnya dengan mencampur selama pemanasan. Aduk perlahan untuk menghindari terbentuknya busa. Tempatkan media dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 $\pm$ 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

G.1.3 Media glukosa dan pepton ditambahkan lesitin-polisorbat 80 (kaldu GPLP 80)

G.1.3.1 Komposisi

-	glukosa	20,0 g
-	ekstrak *yeast*	2,0 g
-	magnesium sulfat	0,5 g
-	pepton	5,0 g
-	kalium hidrogen fosfat	1,0 g
-	lesitin	1,0 g
-	polisorbat 80	7,0 g
-	air	1.000 ml

G.1.3.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut atau media dehisrasi lengkap dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 5,7 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

G.1.4 Kaldu penetralisir D/E (*Dey/Engley neutralizing broth*)

G.1.4.1 Komposisi

-	glukosa	10,0 g
-	*soybean* lesitin	7,0 g
-	natrium tiosulfat pentahidrat	6,0 g
-	polisorbat 80	5,0 g
-	*pancreatic digest of casein*	5,0 g
-	natrium bisulfit	2,5 g
-	ekstrak *yeast*	2,5 g
-	natrium tioglikolat	1,0 g
-	*bromocresol purple*	0,02 g
-	air	1.000 ml

G.1.4.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut atau media dehisrasi lengkap satu per satu dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,6 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

G.1.5 Media *soybean-casein-digest-lesitin-polisorbat 80* (kaldu SCDLP 80)

G.1.5.1 Komposisi

-	kasein pepton	17,0 g
-	*soybean peptone*	3,0 g
-	natrium klorida	5,0 g
-	kalium hidrogen fosfat	2,5 g

- glukosa 2,5 g
- lesitin 1,0 g
- polisorbat 80 7,0 g
- air 1.000 ml

G.1.5.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut atau media dehisrasi lengkap dalam air mendidih sampai tercampur sempurna. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,2 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

G.2 Media agar lainnya untuk uji kesesuaian

G.2.1 Media *potato dextrose agar* (PDA)

G.2.1.1 Komposisi

- ekstrak *potato* 4,0 g
- *dextrose* 20,0 g
- agar 15,0 g
- air 1.000 ml

G.2.1.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut atau media dehidrasi lengkap dengan pemanasan. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 5,6 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

G.2.2 Media *soybean-casein digest agar* (SCDA) atau *tryptic soy agar* (TSA)

G.2.2.1 Komposisi

- *pancreatic digest of casein* 15,0 g
- *papaic digest of soybean meal* 5,0 g
- natrium klorida 5,0 g
- agar 15,0 g
- air 1.000 ml

G.2.2.2 Persiapan

Larutkan semua komponen tersebut atau media dehidrasi lengkap dengan pemanasan. Tempatkan pada labu yang sesuai dan sterilkan pada 121 °C selama 15 menit.

Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 7,3 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

G.3 Media agar selektif lainnya – media agar *potato dextrose* dengan antibiotik

G.3.1 Komposisi

-	ekstrak *potato*	4,0 g
-	*dextrose*	20,0 g
-	agar	15,0 g
-	kloramfenikol	0,05 g
-	air	1.000 ml

G.3.2 Persiapan

Larutkan semua komponen dan tempatkan media dalam wadah yang sesuai. Sterilkan pada autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi dan pendinginan, pH harus setara dengan 5,6 ± 0,2 bila diukur pada suhu ruangan.

Sebagai alternatif, kloramfenikol dapat diganti dengan penggunaan 0,10 g kalium benzilpenisilin dan 0,10 g *tetracycline* per liter media, ditambahkan sebagai larutan steril sesaat sebelum digunakan.

Bibliografi

[1] SNI ISO 7213:2015, Pulp – Pengambilan contoh untuk pengujian

[2] Peraturan Kepala BPOM RI Nomor 17 Tahun 2014 tentang Perubahan atas Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.03.1.23.07.11.6662 tahun 2011 tentang Persyaratan Cemaran Mikroba dan Logam Berat dalam Kosmetika

[3] Peraturan Kepala BPOM RI Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 tahun 2011 tentang Metode Analisis Kosmetika

[4] ISO 22717:2015 Cosmetics -- Microbiology -- *Detection of Pseudomonas aeruginosa*

[5] ISO 22718:2015 Cosmetics -- Microbiology -- *Detection of Staphylococcus aureus*

[6] ISO 18416:2015 Cosmetics -- Microbiology -- *Detection of Candida albicans*

[7] ISO 16212-2017 Cosmetics — Microbiology — *Enumeration of yeast and mould*

[8] ISO 21149-2017 Cosmetics — Microbiology — *Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria*

[9] CNS 8157 Wet wipes

Informasi pendukung terkait perumus standar

[1] KomiteTeknisPerumus SNI
KomiteTeknis11-11 Produk Higiene Perbekalan Kesehatan Rumah Tangga

[2] Susunan keanggotaan KomiteTeknis perumus SNI

Ketua	:	Beluh Mabasa Ginting	-	Kementerian Kesehatan
Sekretaris	:	Ririn Setiaasih	-	Badan Standardisasi Nasional
Anggota	:	1. Arif Usman	-	Kementerian Perindustrian
		2. Augustine Zaini	-	Pakar
		3. Nina Elyani	-	Kementerian Perindustrian
		4. Novi Anggraini	-	PT. Asia Pacific Fortuna Sari
		5. Zaky Aulia	-	PZ. Cussons Indonesia
		6. Natalya Kurniawati	-	YLKI
		7. Hendra Pardede	-	Mastan

[3] Konseptor rancangan SNI
Gugus kerja Komtek 11-11

[4] Sekretariat pengelola KomiteTeknis perumus SNI
Bidang Pertanian, Pangan dan Kesehatan
Pusat Perumusan Standar
Badan Standardisasi Nasional